Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 19, No. 1, Mar- Apr 2023, p. 169-180

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۹، شماره ۱، فروردین - اردیبهشت ۱۴۰۲ ص.۱۸۰-۱۶۹

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir
Research Paper

Production and Evaluation of Nanoliposomes Loaded with *Capparis spinosa* Extract

M. Salamatian[1], Y. Zahedi[2*], R. Shaddel[3]

Received: 2022.05.01
Revised: 2022.07.27
Accepted: 2022.08.01
Available Online: 2022.08.01

How to cite this article:
Salamatian, M., Zahedi, Y., & Shaddel, R. (2023). Production and evaluation of nanoliposomes loaded with *Capparis spinosa* extract. *Iranian Food Science and Technology Research Journal* 19(1): 169-180. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.76151.1162

Introduction

Capparis spinosa is a perennial herb from the *Capparidaceae* family that is mainly distributed in arid and semi-arid regions. Its fruits are oval shaped, approximately 3 cm long, greenish in color with red pulp**.** *Capparis spinosa* extract is a rich source of phenolic compounds. The instability of phenolic compounds in the environmental conditions as well as their bitter or astringent taste has created challenges for the use of these compounds in the food industry. Encapsulation is a method that can positively affect bioaccessibility and bioavailability as it ensures the coating of the active component and its targeted delivery to a specific part of the digestive tract and controlled release. Encapsulation using nanoliposomes seems to be an appropriate technique to overcome these issues. Nanoliposomes are the nanometric version of liposomes. Liposomes are spherical particles composed of lipid molecules (mainly phospholipids) that tend to accumulate in polar solvents such as water in the form of bilayer membranes. Encapsulation with liposomes is an effective way to preserve the intrinsic properties of bioactive compounds during storage and production of foods fortified with them, as well as a physicochemical barrier against prooxidant agents such as free radicals, oxygen and UV.

Materials and Methods

Materials: *Capparis spinosa* fruits, were collected from subtropical regions of Ilam province (Iran). Folin ciocalteu, gallic acid and tween 80 from Merck (Germany), cholesterol and phosphatidylcholine from Sigma- Aldrich (Germany) were obtained.

Methods: The extract was obtained from *capparis spinosa* fruit powder using ultrasonic bath (Backer, vCLEAN 1-L6, Iran). The phenolic content was measured by folin ciocalteu method. Nanoliposomes containing *capparis spinosa* extract were prepared in ratios of 60- 0, 50- 10, 40- 20 and 30- 30 w/w lecithin- cholesterol. Then, particle size, PI and zeta potential were measured by DLS (Horiba, Japan) at 25 ºC. After calculating the encapsulation efficiency using its corresponding equation, the investigation of possible reactions between *capparis spinosa* extract and phospholipids was performed using FTIR at a frequency of 400- 4000 cm^{-1}. In order to observe shape and morphology of nanoliposomes loaded with *capparis spinosa* extract by field emission scanning electron microscopy (FESEM), a drop of sample was poured on the laboratory slide, dried at ambient temperature and then, the sample was coated with gold layer using an ion sputtering device. The stability of the samples was evaluated by visual observation of phase separation and the release rate of phenolic compounds encapsulated in nanoliposomes at ambient temperature over a period of 60 days.

Results and Discussion

1, 2 and 3- Former M.Sc Student, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: Y_zahedi@uma.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.2022.76151.1162

The amount of phenolic extract was 6.328 mg of GAE/g dry sample. The average particle size (Z- Average) was in the range of 95.05 to 164.25 nm. Increasing the cholesterol concentration resulted in enhancement of particle size of nanoliposomes. The particle size distribution was in an acceptable range of 0.3 to 0.5 (PI $\leq$ 0.5). The PI of the cholesterol-free nanoliposomes was maximum and significantly higher than that of the others. Addition of cholesterol increased zeta potential from -60.40 to -68.55. Higher zeta potential values indicate a higher and long term stability of the particles. Also, cholesterol led to an increase of encapsulation efficiency (EE). The stability of phenolic compounds loaded in nanoliposomes was affected by cholesterol during storage time via reducing fluidity and permeability of liposomal membrane. Presence of cholesterol also inhibited the membrane rupture and any changes into it. Results of FTIR showed interactions between wall constituents of nanoliposome and *capparis spinosa* extract, and confirmed successful loading of the extract within nanoliposomes. Images of FESEM were in agreement with DLS results regarding particle size and particle size distribution.

Conclusion

This study indicate that the nanoliposomes have potential applications in improvement of the shelf life of nutraceuticals, stability of cosmetic materials and drug delivery systems. The phenolic compounds of encapsulated extract showed good stability within two months of storage at room temperature. The results showed that the problem of instability of phenolic compounds, which leads to their limited commercial application, can be solved by encapsulation.

Keywords: Nanoliposome, Nutraceutical, Phenolic compounds

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 19, No. 1, Mar- Apr 2023, p. 169-180

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۹، شماره ۱، فروردین- اردیبهشت ۱۴۰۲ ص. ۱۸۰-۱۶۹

مقاله پژوهشی

تولید و ارزیابی نانولیپوزوم‌های حامل عصاره هندوانه کوهی

معصومه سلامتیان[۱]- یونس زاهدی[۲*]- رضوان شاددل[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۱۱
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۵/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۱۰

چکیده

عصاره هندوانه کوهی سرشار از ترکیبات فنولی است که استفاده از آن بدلیل ناپایداری ترکیبات مذکور در شرایط محیطی و همچنین طعم تلخ یا گس آن‌ها در مواد غذایی محدود شده است. روش‌های ریزپوشانی مانند استفاده از نانولیپوزوم‌ها یکی از ساده‌ترین راهکارهای موجود است. در این پژوهش پس از استخراج عصاره هندوانه کوهی به کمک امواج اولتراسوند و تعیین میزان ترکیبات فنولی آن (۶/۳۲۸ میلی‌گرم معادل اسید گالیک در گرم وزن خشک)، نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره هندوانه کوهی در نسبت‌های وزنی ۶۰-۰، ۵۰-۱۰، ۴۰-۲۰ و ۳۰-۳۰ لستین- کلسترول تهیه شدند. سپس آزمون‌های تعیین اندازه ذرات و پتانسیل زتا جهت تعیین خصوصیات آن‌ها انجام شد. پس از تعیین کارایی ریزپوشانی، آزمون طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR) جهت بررسی واکنش‌های احتمالی عصاره هندوانه کوهی و فسفولیپید انجام گردید. شکل و اندازه نانولیپوزوم‌های با نسبت وزنی ۶۰-۰ لستین- کلسترول بارگذاری شده با عصاره هندوانه کوهی توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FESEM) مشاهده گردید. پایداری نمونه‌ها از طریق محاسبه میزان رهایش ترکیبات فنولی محصور شده در نانولیپوزوم‌ها در دمای محیط و در یک دوره ۶۰ روزه مورد بررسی قرار گرفت. میانگین اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات برای نسبت‌های مختلف به ترتیب در محدوده ۱۶۴/۲۵ -۹۵/۰۵ نانومتر و ۰/۵۱ -۰/۳۲ به دست آمد. میزان پتانسیل زتا نیز در محدوده ۶۰/۴۰- تا ۶۸/۵۵- قرار گرفت. ترکیبات فنولی پس از ۶۰ روز در نانولیپوزوم‌های با نسبت وزنی ۶۰-۰ لستین- کلسترول ۷۲/۴۵٪ و در نانولیپوزوم‌های با نسبت وزنی ۵۰-۱۰ لستین- کلسترول ۷۳/۸۷٪ پایداری داشتند. نتایج نشان داد که مشکل ناپایداری ترکیبات فنولی که منجر به کاربرد محدود تجاری آن‌ها می‌شود با ریزپوشانی قابل برطرف شدن است.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات فنولی، غذا-دارو، نانولیپوزوم

مقدمه

هندوانه کوهی با نام علمی *Capparis spinosa* غنی از ترکیبات فنولی می‌باشد که این ترکیبات مهمترین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به شمار می‌آیند (Khanavi *et al*., 2020). رشد این گیاه در کمبود مواد مغذی و مقاومت آن به شرایط سخت، خاک‌های شور، گرما و آفتاب شدید، سبب پراکندگی گسترده آن در ایران شده است (Anwar *et al*., 2016; Akhavan Moghanloo *et al*., 2019). میوه‌های هندوانه کوهی بیضی شکل و طول آن‌ها تقریبا ۳ سانتی متر می‌باشد. رنگ پوسته میوه سبز و داخل میوه قرمز و پر از دانه‌های کوچک و لزج است. میوه‌ها سرشار از کلسیم، پتاسیم، سدیم، روی، مس، منگنز و آهن هستند. همچنین پوست و عصاره آبی میوه دارای فعالیت‌های ضد التهابی و ضد قارچی می‌باشد و نیز عصاره میوه در موش‌ها اثر ضد قندخون نشان داده است. دیابت و عوارض قلبی- عروقی با مصرف میوه‌های خشک هندوانه کوهی بهبود (Anwar *et al*., 2016; Ghani *et al*., 2017). هندوانه کوهی از منابع غنی از ویتامین‌ها، مواد معدنی ضروری و ترکیبات فنولی و فلاونوییدی است (Anwar *et al*., 2016). حساسیت و ناپایداری پلی فنول‌ها به شرایط محیطی همچنین طعم تلخ یا گس آن‌ها، استفاده از این ترکیبات در محصولات غذایی و دارویی مختلف را با چالش‌های بسیاری مواجه

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: Y_zahedi@uma.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.2022.76151.1162

کرده است. یکی از راه‌های اصلی به حداقل رساندن این معایب، ریزپوشانی این ترکیبات می‌باشد (Nemati and Gharehkhani, 2018). فناوری نانولیپوزوم یکی از کاربردی‌ترین سیستم‌های ریزپوشانی و رهایش کنترل شده می‌باشد که از آنتی اکسیدان‌ها محافظت کرده و دسترسی زیستی به آن‌ها را افزایش می‌دهد. نانولیپوزوم‌ها نسخه نانومتری لیپوزوم‌ها هستند که از یک یا چند لایه لیپیدی و یا فسفولیپیدی تشکیل شده‌اند. از مزیت‌های سیستم‌های لیپوزومی در مقایسه با سایر روش‌های محصورسازی این است که آن‌ها از ترکیباتی تشکیل شده‌اند که برای سلامتی ما مفید می‌باشند. تحقیقات صورت گرفته در مورد عملکرد بیولوژیکی فسفولیپیدها و اسفنگولیپیدها مزیت‌های سلامت بخشی از جمله محافظت از کبد، بهبود حافظه و ممانعت از جذب کلسترول را شناسایی کرده‌اند (Mozafari *et al.*, 2008). ریز پوشانی مواد غذا- دارو در حامل‌های لیپیدی، منجر به افزایش قابلیت زیست فراهمی مواد فعال، رهایش کنترل شده و دقیق آن‌ها، حفظ پایداری آن‌ها در برابر شرایط مختلف محیطی و حلالیت مواد فعال آبگریز در محیط آبی می‌شود (Ghanbarzadeh *et al.*, 2016a). همچنین از برهم‌کنش‌های نامطلوب ترکیبات غذا-دارو با ترکیبات موجود در ماتریکس غذایی جلوگیری به عمل می‌آید (Ghanbari *et al.*, 2016). هدف از این تحقیق استخراج مواد زیست فعال هندوانه کوهی و نانوریزپوشانی آن‌ها با استفاده از نانولیپوزوم و سپس بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانوذرات حاصله است.

مواد و روش‌ها

مواد

میوه‌های بالغ هندوانه کوهی در اواسط تابستان از مناطق نیمه گرمسیری استان ایلام جمع‌آوری و تا زمان استفاده در درمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (شکل ۱). اتانول ۹۶٪ و استیک اسید گلاسیال از شرکت مجللی، کربنات سدیم از شرکت آروین شیمی دلتا، فولین سیوکالچو، گالیک اسید و توبین ۸۰ از شرکت مرک آلمان، کلسترول و فسفاتیدیل کولین سویا از شرکت سیگما آلدریچ آلمان تهیه گردید.



شکل ۱- نمایی از میوه هندوانه کوهی استفاده شده

Fig. 1- The used *capparis spinosa* fruit picture

روش‌ها

تهیه پودر میوه هندوانه کوهی

میوه‌های هندوانه کوهی توسط خشک کن انجمادی (Christ مدل ALPHA 1-4 LD، آلمان) در دمای ۴۸- تا ۵۱- درجه سانتی‌گراد و فشار ۰/۱۱ میلی‌بار خشک شدند و سپس توسط دستگاه آسیاب بصورت پودر درآمدند.

عصاره‌گیری

پودر میوه هندوانه کوهی با اتانول ۹۶٪ (نسبت ۱:۲۰) ترکیب شده و جهت افزایش میزان استخراج درون حمام اولتراسونیک (Backer مدل vCLEAN 1- L6، ایران) با دمای ۳۰ °C در دو مدت زمان ۳۰ و ۶۰ دقیقه و با فرکانس ۴۰ کیلو هرتز قرار داده شد. سپس به مدت ۲ ساعت روی شیکر قرار داده شده و در طول شب در محیط تاریک و دمای اتاق (۲±۲۲ °C) نگهداری گردید تا عصاره‌گیری انجام شود. روز بعد فیلتراسیون با استفاده از کاغذ صافی انجام گرفت. سپس تحت فشار کاهش یافته و دمای ۴۵ °C توسط روتاری اواپراتور (Ika مدل RV 05 basic، آلمان) حلال، بازیابی و از عصاره جدا شد. عصاره حاصل برای تبخیر باقیمانده حلال و خشک شدن به مدت ۴۸ ساعت در آون ۴۰ °C نگهداری شد و سپس به فریز درایر (ZiRBUS مدل Vaco 5، آلمان) انتقال داده شد تا فرآیند خشک شدن تکمیل گردد.

اندازه‌گیری بازده استخراج عصاره هندوانه کوهی

با تقسیم کردن وزن عصاره خشک به دست آمده بر وزن ماده اولیه، بازده استخراج عصاره محاسبه شد.

اندازه‌گیری ترکیبات فنولی عصاره هندوانه کوهی

به منظور اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنولی از روش فولین–سیوکالچو استفاده شد. پس از تهیه محلول آبی عصاره در غلظت ۲۵۰۰ ppm، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول عصاره با ۲/۵ میلی‌لیتر محلول ۱۰٪ فولین سیوکالچو مطابق روش کسا و همکاران (Kossah *et al.*, 2011) مخلوط شد. سپس ۲ میلی‌لیتر محلول ۷/۵٪ کربنات سدیم به آن افزوده شد و پس از فویل پیچی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (BEL PHOTONICS مدل UV-M51، ایتالیا) خوانده شد. این آزمایش در سه تکرار انجام شد. منحنی استاندارد بر اساس گالیک اسید ترسیم شد و میزان ترکیبات فنولی برحسب میلی گرم گالیک اسید در هر گرم هندوانه کوهی تعیین شد.

آماده‌سازی نانولیپوزوم‌های حامل عصاره هندوانه کوهی

نانولیپوزوم‌های حامل عصاره هندوانه کوهی در نسبت‌های وزنی ۶۰-۰، ۵۰-۱۰، ۴۰-۲۰ و ۳۰-۳۰ لستین- کلسترول تهیه شدند. بدین منظور پس از تهیه بافر سدیم استات ۲۵۰ میلی‌مولار و تنظیم pH آن روی ۳/۵، مقادیر مختلف لستین در بافر تحت حرارت ملایم روی همزن مغناطیسی هیتردار (آلفا مدل D500، ایران) به مدت ۲ ساعت هم زده شد و یک شب در یخچال نگهداری شد تا به خوبی هیدراته گردد. سپس به نسبت ۱۰ میلی‌لیتر بافر استفاده شده ۲۵ میلی‌گرم عصاره، ۲۰ میلی‌گرم امولسیفایر توئین ۸۰ جهت بهبود پایداری سیستم لیپوزومی و نسبت‌های ذکر شده از کلسترول، به لستین هیدراته شده افزوده شد. مخلوط حاصل توسط همزن مغناطیسی هیتردار هم زده شد و پس از اختلاط کامل، جهت کاهش اندازه ذرات تا مقیاس نانو توسط هموژنایزر (Ika مدل T25 digital، آلمان) به مدت ۵ دقیقه با ۲۰ هزار دور در دقیقه در دمای بالاتر از دمای انتقال فاز فسفاتیدیل کولین سویا که $52\ ^{o}C$ می‌باشد، هموژن گردید و پس از آن، ۵ دقیقه (۱۵ ثانیه روشن و ۵ ثانیه خاموش) در حمام اولتراسونیک با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز تحت امواج اولتراسوند قرار گرفت.

ارزیابی نانولیپوزوم‌های حامل هندوانه کوهی

اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتا

اندازه ذرات و پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌های هندوانه کوهی توسط دستگاه DLS[1] اندازه‌گیری شد. برای این منظور نمونه‌ها به نسبت ۱ به ۵۰ با آب دیونیزه رقیق شده و اندازه‌گیری برای تمام نمونه‌ها در دو تکرار و در دمای $25\ ^{o}C$ انجام گرفت.

بازده ریزپوشانی ترکیبات فنولی (EE)[2]

بازده ریزپوشانی با ترکیبی از روش‌های ذکر شده توسط توکلی و همکاران (Tavakoli *et al.*, 2018) و سقاشیرپور (Saghashirpour, 2014) تعیین شد. بدین منظور ۱۰ میلی لیتر از محلول نانولیپوزومی به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد (Hettich مدل universal centrifuge، آلمان). پس از جداسازی مایع رویی لیپوزوم‌ها، با نسبت ۲ به ۱ با کلروفرم ۰/۱ نرمال ورتکس شد تا غشای لیپوزومی شکسته شود و ترکیبات فنولی آزاد گردند. سپس با استفاده از فیلتر ۰/۴۵ میلی‌متری فیلتراسیون انجام شد و میزان ترکیبات فنولی کپسوله شده و آزاد با استفاده از اسپکتوفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد کارایی ریزپوشانی با استفاده از رابطه ۱ محاسبه گردید:

$$\text{درصد ریزپوشانی} = \frac{\text{میزان ترکیبات فنولی کپسوله شده در لیپوزوم}}{\text{میزان ترکیبات فنولی موجود در کل محلول لیپوزومی}} \times ۱۰۰ \qquad (۱)$$

پایداری ترکیبات فنولی در نانولیپوزوم‌های حامل عصاره هندوانه کوهی طی ۶۰ روز نگهداری

ترکیبات فنولی آزاد و لیپوزومی (پس از تخریب دیواره لیپوزومی) در طی ۶۰ روز نگهداری در دمای $25\ ^{o}C$ و در روزهای ۱، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری و با روز اول مقایسه شد تا تاثیر ساختار لیپوزوم بر پایداری شیمیایی تعیین گردد.

طیف سنجی مادون قرمز (FTIR)[3]

طیف سنجی مادون قرمز برای بررسی واکنش‌های احتمالی عصاره هندوانه کوهی– فسفولیپید در دامنه طول موج $4000\ cm^{-1}$ – ۴۰۰ و برای هر کدام از مواد دیواره شامل فسفاتیدیل کولین و کلسترول همچنین برای نمونه‌های فریز درای شده عصاره هندوانه کوهی، محلول لیپوزومی هندوانه کوهی و محلول لیپوزومی فاقد عصاره هندوانه کوهی (نانولیپوزوم های خالی) با نسبت‌های لستین–کلسترول ۶۰–۰ و ۱۰–۵۰ انجام گردید.

1- Dynamic Light Scattering

2- Encapsulation Efficiency

3- Fourier-Transform Infrared Spectroscopy

میکروسکوپ الکترونی FESEM[1]

ویژگی‌های سطحی و مورفولوژی لیپوزوم‌های دارای نسبت لستین- کلسترول ۶۰-۰ در ساختار خود توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (MIRA3 FEG-SEM، Tescan، چک) مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور یک قطره از محلول لیپوزومی روی لام آزمایشگاهی قرار گرفت و به مدت یک ساعت در دمای محیط خشک شد. سپس توسط دستگاه اسپاترینگ با لایه‌ای از طلا پوشانده شد و تصویر برداری توسط میکروسکوپ الکترونی انجام شد (Yu, 2012).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن ($p<0/05$) با استفاده از نرم افزار آماری SAS انجام شد. برای بررسی پایداری ترکیبات فنولی در نانولیپوزوم‌ها طی دوره نگهداری، داده‌ها بصورت تکرار در زمان و مقایسه میانگین آن‌ها با روش آزمون LSD صورت گرفت. نمودارها به کمک نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۶ ترسیم شد.

نتایج و بحث

بازده استخراج عصاره هندوانه کوهی

در این پژوهش جهت افزایش میزان استخراج عصاره هندوانه کوهی از حمام اولتراسونیک با دمای ۳۰ ^oC و دو مدت زمان ۳۰ و ۶۰ دقیقه بهره گرفته شد و با راندمان استخراج بدون استفاده از اولتراسوند مقایسه شد. بیشترین بازده استخراج عصاره در هنگام اعمال ۶۰ دقیقه اولتراسوند به دست آمد که برابر با ۰/۵۵ ± ۱۲/۳۹٪ بود. بازده استخراج به دست آمده در هنگام اعمال ۳۰ دقیقه اولتراسوند

۰/۹۱± ۱۰/۵ و در صورت عدم استفاده از اولتراسوند ۰/۱۴ ± ۶/۶٪ بود که هر دو مدت زمان اعمال اولتراسوند در مقایسه با استخراج بدون اولتراسوند افزایش بیش از ۱/۵ برابری در میزان بازده استخراج نشان دادند. افزایش استخراج توسط اولتراسوند به پدیده کاویتاسیون[2] نسبت داده شده است.

میزان ترکیبات فنولی عصاره هندوانه کوهی

میزان فنول کل برای عصاره هندوانه کوهی ۶/۳۲۸ میلی‌گرم معادل اسید گالیک در گرم وزن خشک (۶۳۲/۸ میلی گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک) محاسبه شد. میزان فنول کل هندوانه کوهی می‌تواند بسته به شرایط جغرافیایی، مرحله رشد گیاه و بخش‌های مختلف گیاه متفاوت باشد. میزان فنول کل و کربوهیدرات‌ها در طی رسیدن میوه هندوانه کوهی افزایش می‌یابد (Sharafi *et al.*, 2017). در پژوهشی میزان فنول کل هندوانه کوهی ۳۷ میلی‌گرم معادل گالیک اسید در ۱۰۰ گرم وزن خشک گزارش گردید (Aliyazicioglu *et al.*, 2013). آرار و همکاران (Arrar *et al.*, 2013) میزان ترکیبات فنولی عصاره آبی میوه‌ها را ۷ میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم گزارش کردند. در بررسی میزان ترکیبات فنولی بخش‌های خوراکی هندوانه کوهی توسط بویار و همکاران (Bhoyar *et al.*, 2018)، میزان ترکیبات فنولی میوه‌ها ۴/۰۷ میلی‌گرم معادل اسید گالیک در گرم وزن خشک گزارش گردید. بر اساس نتایج به دست آمده از این پژوهش، میوه هندوانه کوهی مقادیر مناسبی از ترکیبات فنولی دارد؛ از این رو نیاز به تحقیقات بیشتری جهت استفاده از آن در مدل‌های غذایی وجود دارد تا بتوان آن را جهت غنی‌سازی فراورده‌های غذایی به صنعت غذا معرفی نمود.

ویژگی‌های نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره هندوانه کوهی

اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتا

نتایج حاصل از DLS در جدول ۱ ارائه شده است. اندازه ذرات به صورت Z-average که مقدار میانگین وزنی قطر ذرات می‌باشد برای نسبت‌های مختلف لستین- کلسترول در محدوده ۱۶۴/۲۵-۹۵/۰۵ نانومتر قرار گرفت. همانگونه که مشاهده می‌شود اضافه شدن کلسترول به ساختار لیپوزومی افزایش اندازه ذرات را در پی داشت و با افزایش غلظت این ماده، افزایش اندازه ذرات تشدید گردید. کلسترول می‌تواند پیوستگی مولکول‌های آبگریز غشاء دولایه‌ای را از طریق یکی از این مکانیسم‌ها کاهش دهد: ۱- کلسترول با مولکول‌های فسفولیپید برای تصاحب فضای لیپوفیل در غشای لیپیدی رقابت می‌کند (Fang *et al.*, 2001). ۲- کلسترول با کاهش انعطاف‌پذیری غشاء دو لایه‌ای سبب به‌هم پیوستن مولکول‌های لیپوفیل به غشاء لیپیدی می‌شود (Mohammed *et al.*, 2004). مالیروس و همکاران (Malheiros *et al.*, 2012) به نتیجه مشابهی دست یافتند؛ آنها عنوان کردند که افزودن کلسترول سبب افزایش قطر وزیکول‌ها در لیپوزوم‌های حاوی نایسین گردید.

همچنین، در تولید نانولیپوزوم‌های اسانس باریجه، افزودن کلسترول به ساختار لیپوزومی اندازه ذرات را افزایش داد (Najaf najafi *et al.*, 2019). به علاوه در پژوهشی روی لیپوزوم‌های تولید شده به روش هیدراسیون لایه نازک افزودن کلسترول منجر به سفتی ساختار لیپوزومی و افزایش اندازه ذرات شد (Tseng *et al.*, 2007). نتایج متفاوتی در مورد اثر کلسترول بر اندازه ذرات لیپوزومی گزارش شده است؛ قنبرزاده و همکاران (Ghanbarzadeh *et al.*,

1-Field Emission Scanning Electron Microscope
2- Cavitation

2016b) در تهیه نانولیپوزوم‌های ویتامین A پالمیتات گزارش نمودند که افزودن کلسترول اثر معنی داری بر اندازه ذرات نداشته است. بر خلاف این یافته‌ها ویریاروج و همکاران (Viriyaroj *et al.*, 2009) مشاهده نمودند افزودن کلسترول به ساختار لستینی نانولیپوزوم سبب کاهش اندازه ذرات از ۷۲ به ۶۳ نانومتر گردید.

جدول ۱- اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتای محلول لیپوزومی حاوی عصاره هندوانه کوهی تهیه شده با نسبت‌های مختلف لستین و کلسترول

Table 1- Average particle size, particle size distribution and zeta potential of liposomes loaded with *Capparis spinosa* fruit extract, and prepared with various quantities of lecithin and cholesterol

Lecithin: cholesterol (w:w) نسبت لستین و کلسترول (وزنی/ وزنی)	Z- Average (nm) میانگین وزنی قطر ذرات (نانومتر)	Polydispersity index (PI) شاخص پراکندگی ذرات	Zeta potential (mv) پتانسیل زتا (میلی ولت)
60 : 0	95.05 ± 5.30[c]	0.517 ± 0.06[a]	-60.40 ± 0.42[b]
50 : 10	118.5 ± 0.28[b]	0.329 ± 0.02[b]	-63.05 ± 2.75[b]
40 : 20	130.05 ± 5.58[b]	0.382 ± 0.02[b]	-68.55 ± 0.35[a]
30 : 30	164.25 ± 14.49[a]	0.364 ± 0.05[b]	-68.45 ± 1.20[a]

میانگین‌های با حروف کوچک متفاوت در هر ستون تفاوت معنی‌دار دارند ($p<0.05$).

Different small letters in each column indicate significant difference at $p< 0.05$.

از عواملی که نقش مهمی در برهمکنش‌های الکترواستاتیکی و پایداری سیستم‌های ریزپوشانی دارد، پتانسیل زتا می‌باشد. به طور کلی، اگر پتانسیل زتای کل سیستم کلوئیدی بالاتر از ±۳۰ میلی ولت باشد، ذرات از نظر دافعه الکترواستاتیکی پایدار هستند (Lu *et al.*, 2011). در این پژوهش با افزودن کلسترول پتانسیل زتا نیز افزایش نشان داد. در حقیقت کلسترول با سفت نمودن ساختار غشا و افزایش پتانسیل زتا و دفع الکترواستانیک بین ذرات، سبب پایداری لیپوزوم‌ها می‌گردد (Liu, 2000). در دیگر مطالعات انجام شده نیز نتایج مشابهی به دست آمده است. محمدی و همکاران (Mohammadi *et al.*, 2013) در تهیه نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین D3 بیان کردند که با افزایش مقدار کلسترول، پتانسیل زتا بطور تدریجی افزایش یافت.

PI برای نسبت‌های مختلف لستین- کلسترول در محدوده ۰/۵۱ -۰/۳۲ قرار گرفت. با اضافه شدن کلسترول به غشای نانولیپوزوم هرچند قطر ذرات افزایش پیدا کرد ولی تاثیر مثبتی روی PI ایجاد کرد و باعث کاهش اختلاف اندازه و یکدست‌تر شدن اندازه ریزپوشینه‌ها گردید. اگر مقدار PI≤۰/۱ باشد نمایانگر بالاترین کیفیت توزیع، PI≤ ۰/۳ به عنوان مقدار بهینه و PI≤ ۰/۵ مقدار قابل قبول می‌باشد (Shah *et al.*, 2014). با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش، PI در دامنه قابل قبول قرار داشت.

در این پژوهش، نانولیپوزوم‌های با نسبت ۶۰-۰ لستین- کلسترول که کوچکترین اندازه ذرات را دارا بودند و نانولیپوزوم‌های با نسبت ۵۰- ۱۰ لستین- کلسترول که در بین نانولیپوزوم‌های دارای کلسترول، اندازه ذرات کوچکتری ایجاد کرده بودند برای انجام آزمون‌های بعدی انتخاب شدند.

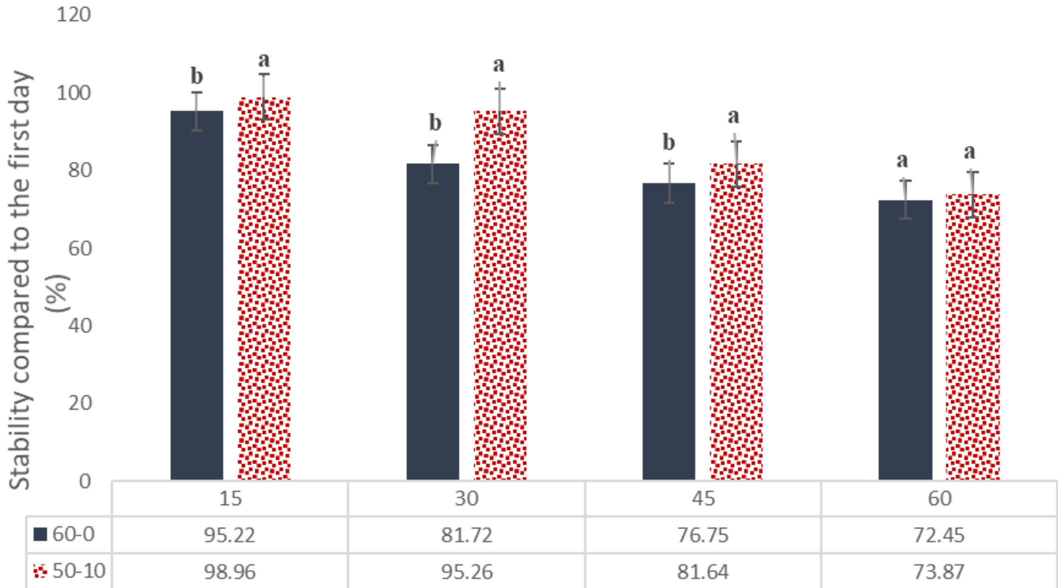
بازده ریزپوشانی (EE) عصاره هندوانه کوهی

بازده ریزپوشانی نشان دهنده پتانسیل مواد دیواره در به دام انداختن و همچنین میزان ماندگاری مواد محصور شده درون ریز-پوشینه‌ها می‌باشد (Soleimanifard *et al.*, 2018). بازده ریزپوشانی عصاره هندوانه کوهی برای نسبت ۶۰-۰ لستین- کلسترول ۸۹/۳۵٪ و برای نسبت ۵۰-۱۰ لستین- کلسترول ۹۵/۷۵٪ به دست آمد. از آنجایی که فضای آبدوست لیپوزوم‌ها بیشتر از فضای آبگریز آن‌هاست درصد بالای ریزپوشانی در هر دو نسبت می‌تواند به دلیل بیشتر بودن بخش هیدروفیل عصاره و اتصال آن به سطح داخلی و خارجی نانولیپوزوم‌ها و همچنین قرار گرفتن در فاز آبی داخلی نانولیپوزوم‌ها باشد. بیشتر بودن بازده ریزپوشانی نمونه دارای کلسترول می‌تواند به دلیل تاثیر کلسترول بر کاهش سیالیت غشا باشد. در مطابقت با نتیجه این تحقیق، فن و همکاران (Fan *et al.*, 2008) بیان داشتند که کلسترول تا غلظت‌های مشخصی به دلیل تاثیر بر کاهش سیالیت غشا سبب افزایش پایداری غشا و افزایش بازده ریزپوشانی می‌گردد ولی اگر غلظت کلسترول بیش از حد افزایش یابد با گسستن غشای لیپوزومی بازده ریزپوشانی را کاهش می‌دهد. در مغایرت با یافته‌های پژوهش حاضر، لاریدی و همکاران (Laridi *et al.*, 2003) در پی تولید لیپوزوم‌های نایسین Z به این نتیجه رسیدند که افزایش کلسترول سبب کاهش کارایی درون پوشانی گردید.

پایداری ترکیبات فنولی در نانولیپوزوم‌های حامل هندوانه کوهی طی ۶۰ روز نگهداری

پایداری ترکیبات فنولی در نانولیپوزم‌ها با توجه به میزان کاهش ترکیبات فنولی محصور شده در نانولیپوزوم‌های با نسبت ۶۰-۰ و ۱۰-

۵۰ لستین- کلسترول طی نگهداری در دمای ۲۵ ^oC به مدت زمان‌های ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز بررسی شد. کاهش میزان ترکیبات فنولی محصور شده در طی زمان، بیانگر کاهش میزان پایداری بود. نتایج در شکل ۲ آورده شده است.



شکل ۲- پایداری ترکیبات فنولی در نانولیپوزوم‌های حامل هندوانه کوهی با نسبت ۶۰-۰ و ۵۰-۱۰ لستین- کلسترول طی ۶۰ روز نگهداری در دمای محیط

حروف ناهمسان، نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال$p<0/05$ در همان روز اندازه‌گیری می‌باشد.

Fig. 2. Phenolic compounds stability in nanoliposomes loaded with *capparis spinosa* extract prepared in ratios of 60- 0, 50- 10 lecithin- cholesterol during 60 days storage in ambient temperature

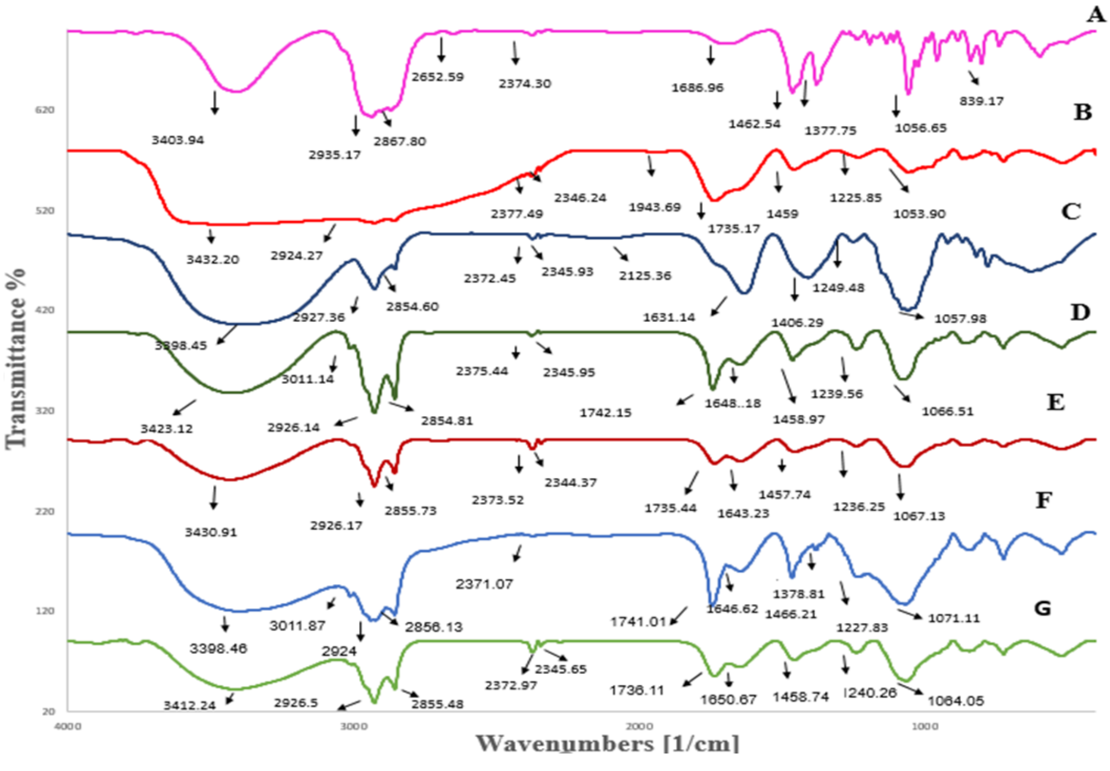
Different letters indicate significant difference at $p>0.05$ at the measurement day.

نتایج نشان داد تا روز ۴۵ نگهداری، پایداری ترکیبات فنولی در نانولیپوزوم دارای کلسترول (۵۰ -۱۰) به طور معنی‌داری بیشتر از نانولیپوزوم فاقد کلسترول (۶۰ -۰) بود ($p<0/05$) ولی پس از آن تفاوت معنی‌داری در درصد پایداری نمونه‌ها مشاهده نشد ($p>0/05$). علت این پدیده به حضور کلسترول نسبت داده شده است. در حقیقت کلسترول، سیالیت و نفوذپذیری غشای لیپوزومی را کاهش داده و سبب افزایش ماندگاری ماده ریزپوشانی شده می‌گردد. در حضور کلسترول به علت ایجاد پیوند با گروه کولین فسفولیپید و پر شدن فضاهای به وجود آمده توسط زنجیره‌های آسیل فسفاتیدیل کولین، وزیکول‌های فسفاتیدیل کولین ساختار محکم‌تر و در نتیجه پایداری بیشتری خواهند داشت (Mohammadi, 2013). همانگونه که در شکل نیز مشخص است میزان پایداری ترکیبات فنولی برای هر دو نسبت لستین- کلسترول در طول زمان روند کاهشی داشته است که رهایش ماده فعال در طی زمان می‌تواند به دلیل تخریب دیواره نانولیپوزوم‌ها در اثر اکسیداسیون فسفولیپید و تراوا بودن غشاء دیواره لیپوزوم باشد (Saghashirpour, 2014). همچنین، افزایش سیالیت غشای لیپیدی به دلیل نگهداری در دمای ۲۵ ^oC ممکن است سبب افزایش نشت ترکیبات فنولی به بیرون از وزیکول‌ها شود (Lu *et al.*, 2011). در واقع دما با تاثیر بر تبدیل فاز ساختار دو لایه‌ای لیپیدی از حالت ژل به کریستال مایع، سبب نقص در چیدمان غشاء و تجزیه شیمیایی فسفولیپیدهای غشا می‌گردد (Bhatia *et al.*, 2004). در مطالعه صورت گرفته روی نانولیپوزوم‌های حامل ویتامین E و C توسط سقاشیرپور (Saghashirpour, 2014)، حدود ۶۲٪ از ویتامین E نانوریزپوشانی شده طی ۶۰ روز نگهداری در دمای اتاق آزاد شد؛ این مقدار در دمای ۴ ^oC حدود ۳۹٪ بود.

طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR)

نتایج FTIR در شکل ۳ آمده است. در کلسترول پیک‌های ۳۴۰۳/۹۴، ۲۹۳۵/۱۷، ۱۶۸۵/۹۶، ۱۴۶۲/۵۴، ۱۳۷۷/۷۵، ۱۱۹۱/۶۱، ۱۰۵۶/۶۵ و ۸۳۹/۱۷ cm^{-1} به ترتیب مربوط به پیوند کششی OH، ارتعاشات کششی نامتقارن CH_2 و CH_3 ، پیوند C=C، ارتعاشات کششی متقارن CH_2 و CH_3، CH_2 و CH_3 خمشی، C-C کششی، تغییر شکل حلقه کلسترول و C-C-C کششی می‌باشند (Gupta, 2014). همچنین در فسفاتیدیل کولین پیک‌های ۳۴۳۲/۲۰،

۲۹۲۴/۲۷، ۱۷۳۵/۱۷، ۱۲۲۵/۸۵ و ۱۰۵۳/۹۰ cm^{-1} به ترتیب به ارتعاشات OH، ارتعاشات کششی نامتقارن CH2، گروه کربونیل (C=O)، PO_2^- نامتقارن و C-O در $C\text{-}O\text{-}PO_2^-$ مربوط می باشند (Mohan, 2020). در مورد عصاره هندوانه کوهی، با توجه به نتایج نادیانتو و همکاران (Nadiyanto *et al.*, 2019) و فو و همکاران (Fu *et al.*, 2007)، به نظر می‌رسد پیک‌های ۳۳۹۸/۴۵، ۱۶۳۱/۱۴ و ۱۰۵۷/۹۸ cm^{-1} به ترتیب مربوط به گروه NH_2، پیوندهای غیر اشباع حلقه‌های آروماتیک و اتر می‌باشند. در مقایسه نانولیپوزوم‌های خالی با نانولیپوزوم‌های بارگیری شده توسط عصاره هندوانه کوهی، با ورود عصاره به نانولیپوزوم‌های دارای نسبت ۶۰–۰ لستین– کلسترول در دیواره، اکثر پیک‌های جذبی افزایش شدت جذب نشان دادند. همچنین در نمونه ۰–۶۰، پیک جدید ۳۰۱۱/۱۴ cm^{-1} مشاهده گردید که در نانولیپوزوم‌های خالی و همچنین عصاره هندوانه کوهی چنین پیکی مشاهده نشد که احتمالا" نشان دهنده ایجاد پیوند جدید در اثر برهمکنش بین عصاره و مواد دیواره نانولیپوزوم می‌باشد. همچنین با ورود عصاره به نانولیپوزوم‌های دارای نسبت ۵۰–۱۰ لستین–کلسترول، در اکثر پیک‌های جذب، افزایش شدت و در برخی پیک‌ها جابجایی مشاهده گردید؛ از جمله پیک های ۱۴۵۸/۷۴، ۱۲۴۰/۲۶ و ۱۰۶۴/۰۵ cm^{-1} که به ترتیب به نواحی ۱۴۶۶/۲۴، ۱۲۷۷/۸۳و ۱۰۷۱/۱۱ cm^{-1} جابجایی داشتند. همچنین در نانولیپوزوم دارای نسبت ۵۰–۱۰ لستین– کلسترول حامل عصاره هندوانه کوهی، پیک-های جدید ۳۰۱۱/۸۷ و ۱۳۷۸/۸۱ cm^{-1} ایجاد و پیک ۲۳۴۵/۶۵ cm^{-1} موجود در طیف نانولیپوزوم‌های خالی حذف گردید که تغییرات ایجاد شده احتمالا" می‌تواند در نتیجه برهمکنش بین مواد دیواره نانولیپوزوم و عصاره هندوانه کوهی و تاییدی بر بارگذاری موفقیت‌آمیز عصاره هندوانه کوهی در نانولیپوزوم‌ها باشد.

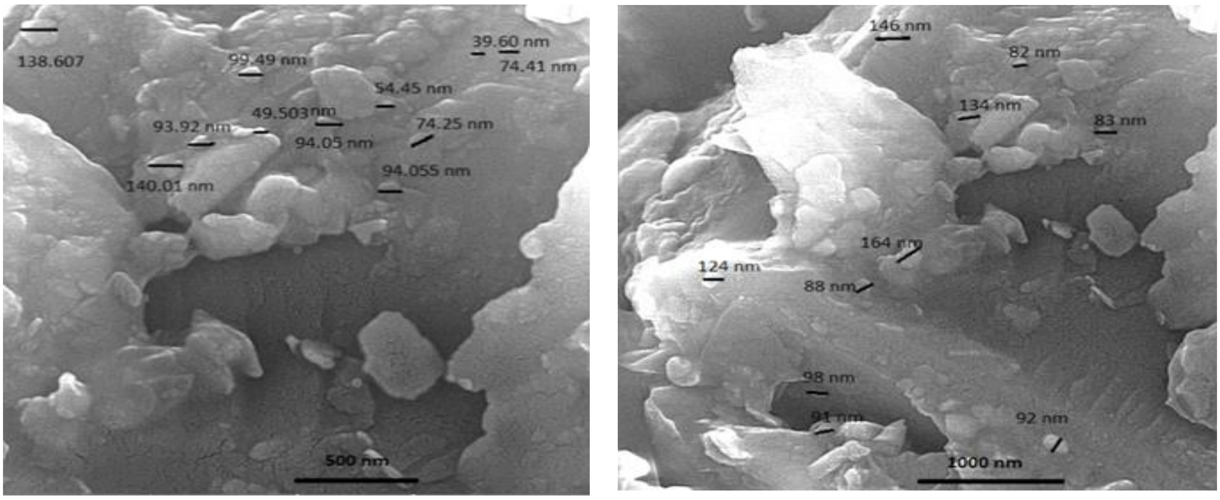


شکل ۳– نتایج آنالیز FTIR. (A= کلسترول B= فسفاتیدیل کولین C= عصاره هندوانه کوهی D= نانولیپوزوم‌های با نسبت ۶۰–۰ لستین– کلسترول حاوی عصاره هندوانه کوهی، E= نانولیپوزوم‌های با نسبت ۶۰–۰ لستین– کلسترول فاقد عصاره هندوانه کوهی F= نانولیپوزوم‌های با نسبت ۵۰–۱۰ لستین– کلسترول حاوی عصاره هندوانه کوهی G= نانولیپوزوم‌های با نسبت ۵۰–۱۰ لستین– کلسترول فاقد عصاره هندوانه کوهی)

Fig. 3- FTIR, (A= cholesterol, B= phosphatidyl choline, C= *Capparis spinosa* extract, D= *Capparis spinosa* loaded nanoliposomes prepared in ratio of 60- 0 lecithin- cholesterol, E= blank nanoliposomes prepared in ratio of 60- 0 lecithin- cholesterol, F= *Capparis spinosa* loaded nanoliposomes prepared in ratio of 50- 10 lecithin- cholesterol, G= blank nanoliposomes prepared in ratio of 50- 10 lecithin- cholesterol)

آنالیز تصاویر FESEM

تصویر FESEM برای نمونه دارای نسبت ۶۰-۰ لستین- کلسترول که کوچکترین اندازه ذرات را در بین نانولیپوزوم‌های تهیه شده دارد، تهیه شد. شکل ۳ تصاویر مربوط به آنالیز FESEM را در دو بزرگنمایی۳۰ هزار و ۵۰ هزار نشان می‌دهد. این تصاویر نتایج حاصل از DLS در رابطه با اندازه نانولیپوزوم‌ها را تایید کرد. همانگونه که در تصویر مشخص است اندازه اکثر ذرات در دامنه قابل قبول و کمتر از ۱۵۰ نانومتر بود. پراکندگی ذرات مشاهده شده نیز در تایید نتایج اندازه‌گیری PI توسط DLS مبنی بر قرار گرفتن در محدوده پراکندگی قابل قبول می‌باشد. تصاویر مربوطه وجود ذرات نانولیپوزومی کروی و تقریبا" بیضوی را نشان داد.



شکل ۴- تصاویر آنالیز FESEM برای نانولیپوزوم دارای نسبت ۶۰-۰ لستین- کلسترول حاوی عصاره هندوانه کوهی

Fig. 4- FESEM images of the *Capparis spinosa* loaded nanoliposomes prepared in ratio of 60- 0 lecithin- cholesterol

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، نانولیپوزوم‌های عصاره هندوانه کوهی در محدوده اندازه ذرات ۱۶۵ -۹۵ نانومتر با موفقیت تولید شدند. اضافه شدن کلسترول به ساختار لیپوزومی، هر چند افزایش در اندازه ذرات را در پی داشت اما از طریق افزایش پتانسیل زتا، سبب افزایش دافعه و پایداری الکترواستاتیکی نانولیپوزوم‌ها گردید و همچنین بازده ریزپوشانی را افزایش داد. ترکیبات فنولی هندوانه کوهی ریزپوشینه شده پس از دو ماه نگهداری در دمای محیط پایداری خوبی از خود نشان دادند. این نتایج نشان می‌دهد که مشکل ناپایداری ترکیبات فنولی که منجر به کاربرد محدود تجاری آن‌ها می‌شود با ریزپوشانی قابل برطرف شدن است و نانوذرات لیپوزومی می‌توانند به عنوان بستری مناسب برای ایجاد پایداری و افزایش دسترسی زیستی مواد زیست فعال برای کاربرد در زمینه های تغذیه و پزشکی معرفی شوند.

منابع

1. Akhavan Moghanloo, S., Ghanbari, E., & Taghipour, P. (2019). *Evaluation of chemical composition and properties of capparis spinosa and its effect on treatment of various diseases*. 2nd international & 6th national confrence on organic va. conventional agriculture, Ardebil, Iran.
2. Aliyazicioglu, R., Eyupoglu, O. E., Sahin, H., Yildiz, O., & Baltas, N. (2013). Phenolic components, antioxidant activity, and mineral analysis of Capparis spinosa L. *African Journal of Biotechnology 12*(47): 6643-6649. https://doi.org/10.5897/AJB2013.13241.
3. Anwar, F., Muhammad, G., Hussain, M.A., Zengin, G., Alkharfy, K.M., Ashraf, M., & Gilani, A.H. (2016). *Capparis spinosa* L.: A plant with high potential for development of functional foods and nutraceuticals/pharmaceuticals. *International Journal of Pharmacology 12*(3): 201-219. https://doi.org/10.3923/ijp.2016.201.219.
4. Arrar, L., Benzidane, N., Krache, I., Charef, N., Khennouf, S., & Baghiani, A. (2013). Comparison between polyphenol contents and antioxidant activities of different parts of *Capparis spinosa* L. *Pharmacognosy Communications 3*(2): 70. https://doi.org/10.5530/pc.2013.2.14.

5. Bhatia, A., Kumar, R., & Katare, O.P. (2004). Tamoxifen in topical liposomes: development, characterization and in-vitro evaluation. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 7*(2): 252-259.
6. Bhoyar, M.S., Mishra, G.P., Naik, P.K., & Singh, S.B. (2018). Evaluation of antioxidant capacities and total polyphenols in various edible parts of *Capparis spinosa* L. collected from trans-Himalayas. *Defence Life Science Journal* 3: 30-36. https://doi.org/10.14429/dlsj.3.12570.
7. Fan, M., Xu, S., Xia, S., & Zhang, X. (2008). Preparation of salidroside nano-liposomes by ethanol injection method and in vitro release study. *European Food Research and Technology 227*(1): 167-174. https://doi.org/10.1007/s00217-007-0706-9.
8. Fang, J.Y., Hong, C.T., Chiu, W.T., & Wang, Y.Y. (2001). Effect of liposomes and niosomes on skin permeation of enoxacin. *International Journal of Pharmaceutics 219*(1-2): 61-72. https://doi.org/10.1016/s0378-5173(01)00627-5.
9. Fu, X.P., Aisa, H.A., Abdurahim, M., Yili, A., Aripova, S.F., & Tashkhodzhaev, B. (2007). Chemical composition of *Capparis spinosa* fruit. *Chemistry of Natural Compounds 43*(2): 181-183. https://doi.org/10.3390/nu10020116.
10. Ghanbari, M., Saeedi, M., & Mortazavian, A. (2016). Nutraceuticals and functional foods production. *Journal of Clinical Excellence 5*(1).
11. Ghanbarzadeh, B., Bashiri, S., Hamishekar, H., & Dehghannya, J. (2016a). The study of the colloidal properties of nano liposomes containing beta-carotene produced by thermal method. *Iranian Food Science and Technology Research Journal 12*(5): 609-619. https://doi.org/10.22067/ifstrj.v12i5.41745.
12. Ghanbarzadeh, B., Pezeshky, A., Hamishekar, H., & Moghadam, M. (2016b). Vitamin A palmitate-loaded nanoliposomes: study of particle size, zeta potential, efficiency and stability of encapsulation. *Iranian Food Science and Technology Research Journal 12*(2): 261-275. https://doi.org/10.22067/ifstrj.v1395i2.38396.
13. Ghani, A., Salehi, S., & Mohtashami, S. (2017). Antioxidant activity, phenolics content and total flavonoids of caper fruit (*Caparis spinosa*) at different maturity stages. *Research Journal of Pharmacognosy* 4: 83-83.
14. Gupta, U., Singh, V.K., Kumar, V., & Khajuria, Y. (2014). Spectroscopic studies of cholesterol: fourier transform infra-red and vibrational frequency analysis. *Materials Focus 3*(3): 211-217. https://doi.org/10.1166/mat.2014.1161.
15. Khanavi, M., Ara, L., Khavassi, N., & Hajimehdipoor, H. (2020). *Capparis spinosa*: a comparative study of raw and processed fruits. *Journal of Medicinal Plants 19*(73): 91-99. https://doi.org/10.29252/jmp.1.73.91.
16. Kossah, R., Zhang, H., & Chen, W. (2011). Antimicrobial and antioxidant activities of Chinese sumac (*Rhus typhina* L.) fruit extract. *Food Control 22*(1): 128-132. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.06.002.
17. Laridi, R., Kheadr, E.E., Benech, R.O., Vuillemard, J.C., Lacroix, C., & Fliss, I. (2003). Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. *International Dairy Journal 13*(4): 325-336. https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00194-2.
18. Liu, D.Z., Chen, W.Y., Tasi, L.M., & Yang, S.P. (2000). Microcalorimetric and shear studies on the effects of cholesterol on the physical stability of lipid vesicles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 172*(1-3): 57-67. https://doi.org/10.1016/S0927-7757(00)00560-4.
19. Lu, Q., Li, D.-C., & Jiang, J.-G. (2011). Preparation of a tea polyphenol nanoliposome system and its physicochemical properties. *Food Chemistry 59*(24): 13004−13011. https://doi.org/10.1021/jf203194w.
20. Malheiros, P.D.S., Sant Anna, V., Barbosa, M.D.S., Brandelli, A., & Franco, B.D.G.D.M. (2012). Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on *Listeria* monocytogenes growth in Minas frescal cheese. *International Journal of Food Microbiology 156*(3): 272-277. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.004.
21. Mohammadi, M., Ghanbarzadeh, B., & Hamishehkar, H. (2014). Formulation of nanoliposomes containing vitamin D3 to enrich a model beverage. *Advanced Pharmaceutical Bulletin 4*(Suppl 2): 569–575. https://doi.org/10.5681/apb.2014.084.
22. Mohammadi, M., Jahadi, M., Ehsani, M.R., & Khosravi-Darani, K. (2013). Application of liposome nano carrier in cheese production and ripening. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology 7*(4): 25-34.
23. Mohammed, A.R., Weston, N., Coombes, A.G.A., Fitzgerald, M., & Perrie, Y. (2004). Liposome formulation of poorly water soluble drugs: optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability. *International Journal of Pharmaceutics 285*(1-2): 23-34. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.07.010.
24. Mohan, V., Naske, C.D., Britten, C.N., Karimi, L., & Walters, K.B. (2020). Hydroxide-catalyzed cleavage of selective ester bonds in phosphatidylcholine: An FTIR study. *Vibrational Spectroscopy* 109: 103055. https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2020.103055.
25. Mozafari, M.R., Khosravi-Darani, K., Borazan, G.G., Cui, J., Pardakhty, A., & Yurdugul, S. (2008). Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. *International Journal of Food Properties 11*(4): 833-844. https://doi.org/10.1080/10942910701648115.

26. Najafi, M., Arianmehr, A., & Mohammadi Sani, A. (2019). Encapsulation of Barije essential oil in nanoliposomal system and evaluation of its physical and antimicrobial properties. *Innovative Food Technologies 7*(1): 71-83. http://dx.doi.org/ 10.22104/JIFT.2019.3573.1859.
27. Nandiyanto, A.B.D., Oktiani, R., & Ragadhita, R. (2019). How to read and interpret FTIR spectroscope of organic material. *Indonesian Journal of Science and Technology 4*(1): 97-118. https://doi.org/10.17509/ijost.v4i1.15806.
28. Nemati, R., & Gharehkhani, M. (2018). *Evaluation of different methods in microencapsulation of bioactive antioxidant compounds*. 2nd international & 5th national congress of food science and technology of Iran, Sari.
29. Saghashirpour, S. (2014). *Production of nanoliposomes for simultaneous encapsulation of vitamin E and vitamin C by thermal method (Mozafari).* MSc. Thesis. Tabriz University.
30. Shah, R., Eldridge, D., Palombo, E., & Harding, I. (2014). Optimisation and stability assessment of solid lipid nanoparticles using particle size and zeta potential. *Journal of Physical Science 25*(1).
31. Sharafi, Z., Ghani, A., Salehi, S., & Mohtashami, S. (2017). Antioxidant activity, phenolics content and total flavonoids of caper fruit (*Caparis spinosa*) at different maturity stages. *Research Journal of Pharmacognosy* 4(Supplement): 83-83.
32. Soleimanifard, M., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Azizi, KH., & Sepahvand, A. (2018). Optimization of Khorramabad Olive leaf extract extraction and investigating the physical properties of nano-structured lipid carriers containing it. *Journal of Nutrition Sciences & Food Technology 13*(3): 81-92.
33. Tavakoli, H., Hosseini, O., Jafari, S.M., & Katouzian, I. (2018). Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of yogurt enriched by olive leaf phenolics within nanoliposomes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry 66*(35). https://doi.org/ 9231-9240. 10.1021/acs.jafc.8b02759.
34. Tseng, L.P., Liang, H.J., Chung, T.W., Huang, Y.Y., & Liu, D.Z. (2007). Liposomes incorporated with cholesterol for drug release triggered by magnetic field. *Journal of Medical and Biological Engineering 27*(1): 29-34.
35. Viriyaroj, A., Ngawhirunpat, T., Sukma, M., Akkaramongkolporn, P., Ruktanonchai, U., & Opanasopit, P. (2009). Physicochemical properties and antioxidant activity of gamma-oryzanol-loaded liposome formulations for topical use. *Pharmaceutical Development and Technology 14*(6): 665-671. https://doi.org/10.3109/10837450902911937.
36. Yu, D.G., Yang, J.H., Wang, X., & Tian, F. (2012). Liposomes self assembled from electrosprayed composite microparticles. *Nanotechnology 23*(10). https://doi.org/105606.10.1088/0957-4484/23/10/105606.